

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08370

研究課題名(和文) 3Dゲノム構造変換がもたらす悪性リンパ腫の進展とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism involved in 3D genome structure in the progression of malignant lymphoma

研究代表者

宮崎 和子 (Miyazaki, Kazuko)

京都大学・医生物学研究所・研究員

研究者番号：00311811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性リンパ腫の自然発症モデルマウス(I_{d2}/I_{d3} dKO)を用いて、正常細胞および活性化・前癌状態から癌細胞へと進展する過程での遺伝子発現、エピジェネティックな変化およびゲノム構造変換を検定した。前癌状態ではスーパーエンハンサーと呼ばれる標的遺伝子の発現量を増幅するようなエンハンサーの活性化は誘導されていたが、TADやクロマチン分画を含めた3Dゲノム構造の変動は伴っていなかった。一方、細胞の癌化に伴い、エンハンサーの活性などは逆に低下したが、TAD構造やクロマチン分画の変動を含めたゲノム構造は大きく変動しており、特異的な遺伝子発現プログラムが発動すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、悪性リンパ腫の自然発症モデルマウスを用いることで、正常細胞と癌細胞を比較するのみでなく、正常細胞が活性化・前癌状態からがん細胞へと進展する過程での遺伝子発現制御を解析したものであり、がん進展のメカニズムの理解につながる社会的意義があると思われる。また、生体内における細胞腫特異的な遺伝子発現制御の理解という学術的に非常に重要な課題の解明に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Using our mouse model of malignant lymphoma (I_{d2}/I_{d3} dKO), we not only compared normal and lymphoma cells, but also examined gene expression, epigenetic changes and genomic structural change during the progression from the activated/precancerous state to lymphoma cells. In the precancerous state, activation of enhancers like super-enhancers, which amplify the expression of target genes, were induced but was not accompanied by changes in 3D genome structure, including TADs and chromatin compartments. On the other hand, with the oncogenic transformation of cells, the activity of enhancers and other factors were conversely reduced, but the genomic structure, including changes in TAD structure, was greatly altered, suggesting that a specific gene expression program is triggered. Further analysis is required to determine how these chromatin changes are induced and how they contribute to the regulation of expression of tumor suppressor genes and other genes.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：ゲノム構造

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

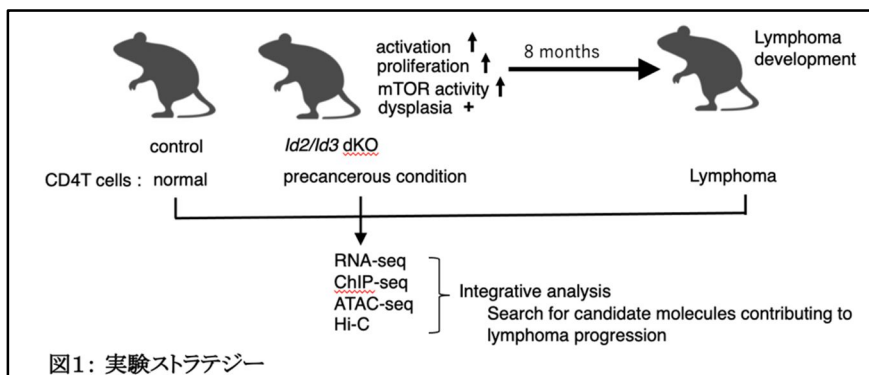
細胞の機能は、細胞種特異的な遺伝子発現プログラムによって規定されるが、この遺伝子発現は、細胞種特異的なエンハンサー機能に依存する。エンハンサーはプロモーター領域と相互作用することで標的遺伝子の発現を制御し、さらには Topological Associating Domain (TAD) と呼ばれる複数の遺伝子座を含むゲノム分画の形成が適正な遺伝子発現に重要であることから、こうしたゲノムの3次元(3D)構造制御は細胞の機能制御にとって非常に重要であると考えられる。一方、癌細胞ではクロマチンループや TAD の形成に重要なクロマチン制御因子 CTCF やコヒーシンといった分子の機能異常が報告され、正常とは異なる 3D ゲノム構造を持ち、がん細胞特有な遺伝子発現制御に影響を与えている可能性が示唆されてきたが(Nat. Genet. 2013, Nat. Genet. 2015, Science 2016, Cancer Discov. 2020)、こうした 3D ゲノム構造どのように確立され維持されているのか、『細胞の癌化において、なぜ癌細胞は 3D ゲノム構造を大きく変容させるのだろうか?』という疑問を持った。しかしながら、正常細胞から前癌細胞、癌細胞へと進展する過程をヒト臨床検体で検証することは不可能である。興味深いことに、ヒト Burkitt リンパ腫においては高頻度に転写制御因子 *Id3* の点変異による機能異常が認められ(Nat. Genet, Nature, 2013)、また我々の研究からも、T 細胞特異的な転写制御因子 *Id2/Id3* 欠損(dKO)によって致死的な悪性リンパ腫を発生することを見出した(Miyazaki et al., Gene & Dev. 2015)。この *Id2/Id3* dKO マウスでは、T 細胞の活性化・増殖能の亢進を認め、mTOR 活性の上昇や核の異形成もあることから前癌状態にあると考えられた。一方、リンパ腫発症まで 8 ヶ月程度の期間を要することから、その間に何か大きな変化が起こっているのではないかと考えた。つまり、このマウスモデルを解析することで、活性化・前癌状態から癌細胞への進展の分子機構の解明ができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、T 細胞特異的な *Id2/Id3* dKO マウスを用いることで、前癌状態から癌細胞へと進展する過程での 3D ゲノム構造変換の分子機構を解明し、その生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

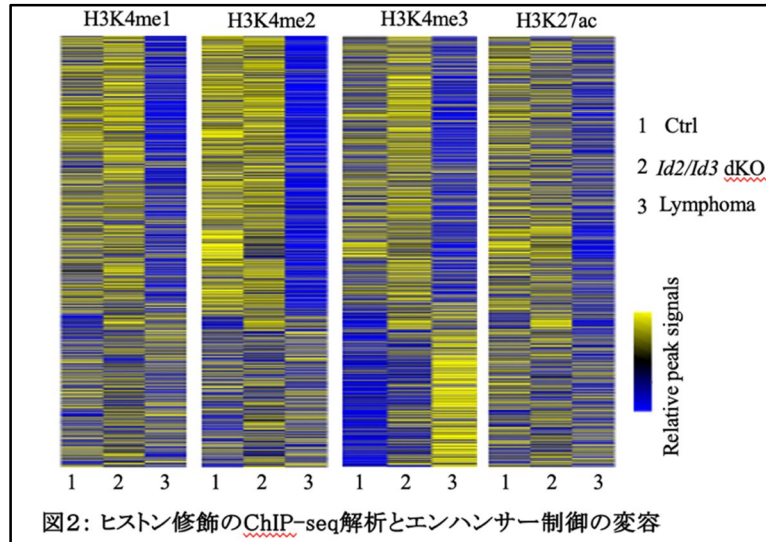
我々が作製した悪性リンパ腫の自然発症モデルマウス(*Id2/Id3* dKO)を用いることで、正常細胞と癌細胞を比較するのみでなく、活性化・前癌状態から癌細胞へと進展する過程での遺伝子発現、ゲノム構造変換を検定する。特にエピジェネティクス解析のために、クロマチン免疫沈降シークエンス (ChIP-seq) 法、オープンクロマチン領域の検定のための ATAC-seq 法、ゲノム構造解析のための Hi-C 解析を行った。使用する細胞としては、野生型 CD4 T 細胞 (control)、活性化 CD4T 細胞として *Id2/Id3* dKO 細胞 (*Id2/Id3* dKO)、そして癌細胞として 8 ヶ月齢以降でリンパ腫を発症した *Id2/Id3* dKO マウスのリンパ腫細胞



(Lymphoma)を用いた (図 1 参照)

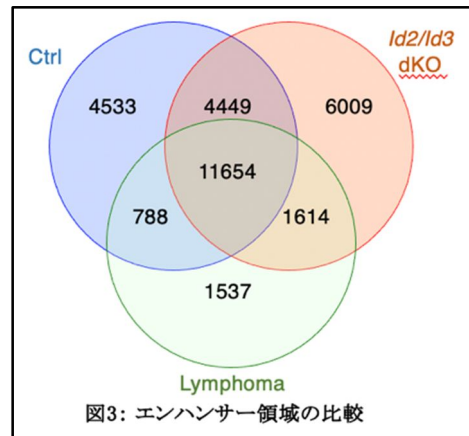
4. 研究成果

図2はChIP-seqによるヒストン修飾の結果を表す。ヒストンH3リジンK4モノメチル/ジメチル/トリメチル化(H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3)はエンハンサーとプロモーター領域を表し、ヒストンH3リジンK27アセチル化(H3K27ac)は、活性化したエンハンサーとプロモーター領域を表す。結果として、controlと比較して活性化型の



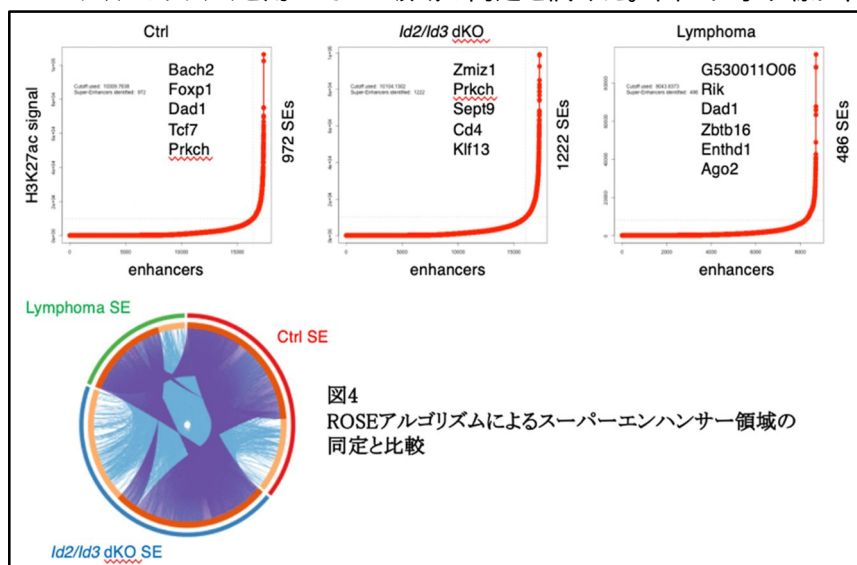
のId2/Id3 dKO細胞では、エンハンサー領域は大きな変動はない様に見える。一方、Lymphoma細胞ではエンハンサー領域が大きく異なることがわかる。そしてH3K4me3の結果から、プロモーター領域の活性化が大きく変動することがわかった。

H3K27acのChIP-seq結果からは、予想に反してLymphoma細胞では全体的な活性化は強くはなく、controlとId2/3dKO細胞とは大きく異なるprofileを示すことがわかった。また図3のVenn diagramは活性化型エンハンサーの重なりを示しているが、controlと比較してId2/Id3 dKO細胞では活性化型エンハンサーの増加を認める一方、Lymphoma細胞ではその数が減少しているという結果が得られた。



最近のエンハンサー解析において、スーパーエンハンサー(SE)と呼ばれる非常に強い活性を示すエンハンサーは、標的遺伝子の発現を高く誘導すること、そしてSEによって制御される遺伝子群は、細胞の特異性や特徴と深く関わることが知られている。そこで、ROSEアルゴリズムを用いてSE領域の同定を試みた。図4に示す様に、controlと比較して

Id2/Id3 dKO細胞ではSE領域が大きく増加する一方、Lymphoma細胞ではSE領域がcontrol細胞の1/2程度まで減少していた。またcircos plot解析からも、Id2/Id3 dKO細胞では活性化に伴い新たなSE領域が増加する一方、Lymphoma

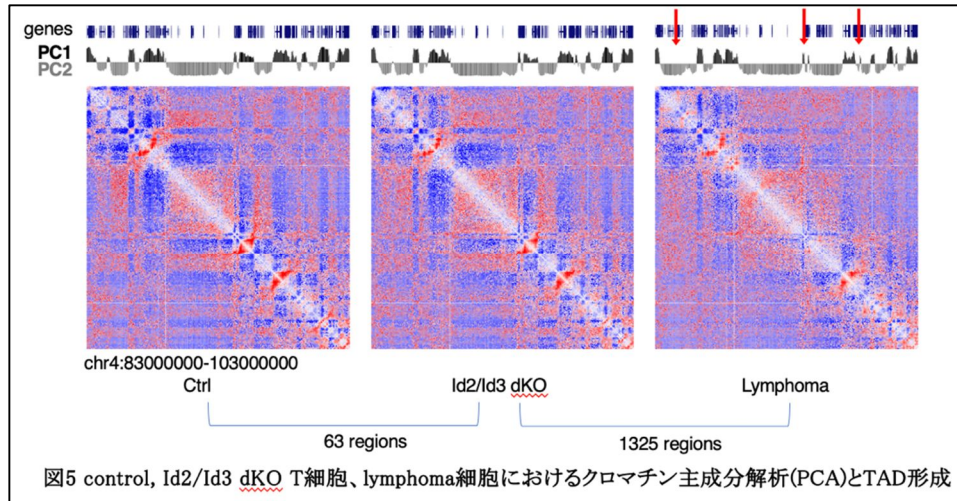


細胞でのSE領域の多くは、control細胞やId2/Id3 dKO細胞のSE領域に含まれており、全く予

想外の結果であった。

そして、各細胞種におけるゲノム構造の変動を調べるため HiC 実験を行い、主成分解析(PCA)を行った。これにより活性化クロマチン分画 (compartment A) と不活性化クロマチン分画 (compartment B) そして TADs の解析を行った。図 5 は chromosome 4 の一部の HiC 解析データを示す。Control と比較して Id2/Id3 dKO 細胞では、クロマチン分画の変化(flipped region)

は 63 カ所しかなかったが、Lymphoma 細胞では Id2/Id3 dKO と比較して 1325 カ所 flipped region を認め



た(図5)。さらに Lymphoma 細胞では、TAD の変動を含めた大きな領域のクロマチン構造が変化していることが明らかとなった。

以上をまとめると、野生型から活性化型細胞へと分化する過程では、エンハンサーの活性化領域が増加すること、とくに SE と呼ばれる標的遺伝子の発現量を増幅する様なエンハンサーの活性化を誘導するが、TAD やクロマチン分画を含めた 3D ゲノム構造の変動は伴わない。一方、細胞の癌化に伴い、エンハンサーの活性などは逆に低下する一方、TAD 構造やクロマチン分画の変動を含めたゲノム構造は大きく変動することで、特異的な遺伝子発現プログラムが発動すると考えられる。今後、どのようにしてこうしたクロマチン変動が誘導されるのか、そのことが癌抑制遺伝子などの発現制御にどう寄与するのか、さらなる解析が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Abe Shinya, Asahi Takuma, Hara Takahiro, Cui Guangwei, Shimba Akihiro, Tani-ichi Shizue, Yamada Kohei, Miyazaki Kazuko, Miyachi Hitoshi, Kitano Satsuki, Nakamura Naotoshi, Kikuta Junichi, Vandenbon Alexis, Miyazaki Masaki, Yamada Ryo, Ohteki Toshiaki, Ishii Masaru, Sexl Veronika, Nagasawa Takashi, Ikuta Koichi	4. 巻 42
2. 論文標題 Hematopoietic cell-derived IL-15 supports NK cell development in scattered and clustered localization within the bone marrow	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113127 ~ 113127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.113127	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hidaka Reiko, Miyazaki Kazuko, Miyazaki Masaki	4. 巻 13
2. 論文標題 The E-Id Axis Instructs Adaptive Versus Innate Lineage Cell Fate Choice and Instructs Regulatory T Cell Differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.890056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kazuko, Miyazaki Masaki	4. 巻 12
2. 論文標題 The Interplay Between Chromatin Architecture and Lineage-Specific Transcription Factors and the Regulation of Rag Gene Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.659761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Genki, Miyazaki Kazuko, Ogata Hiroyuki, Miyazaki Masaki	4. 巻 22
2. 論文標題 The Evolution of Rag Gene Enhancers and Transcription Factor E and Id Proteins in the Adaptive Immune System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5888 ~ 5888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎和子、宮崎正輝
2. 発表標題 Analysis of regulome and alterations of 3D genome structures in malignant lymphoma progression
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎和子、宮崎正輝
2. 発表標題 Synergistic action between E2A and Notch signal determines the cell fate of T cell versus innate lymphoid cell in the thymus
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎和子、宮崎正輝
2. 発表標題 The Synergic Role of E2A and Notch signaling in T cell lineage-specific enhancer regulome
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Baylor Institute for Immunology Research			